

(続紙 1)

京都大学	博士 (理学)	氏名	長崎 信博
論文題目	小脳抑制性シナプス可塑性誘導における α および β CaMKIIの対照的役割		

(論文内容の要旨)

神経細胞はシナプスを介して化学的に情報伝達を行う。中枢神経系の様々なシナプスで、神経活動依存的にその伝達効率が長期間変化するシナプス可塑性が見出され、学習・記憶の細胞レベルでの基礎過程と考えられている。カルシウム・カルモジュリン ($\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$) 依存性キナーゼII (CaMKII) は、シナプス可塑性の誘導に広くかかわる分子である。CaMKIIは10~14個のサブユニットが会合してはたらくホロ酵素で、 $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$ と結合して活性化すると、隣り合うサブユニット間でリン酸化しあい、 Ca^{2+} 非依存的に活性を維持する。中枢神経系には、 α と β と呼ばれる2種類のCaMKIIサブユニットが発現する。 α CaMKIIは、 β と比べて $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$ へ高い親和性を持ち、さらに細胞骨格分子であるF-actinと結合する。しかし、これらの違いがシナプス可塑性誘導にどのように影響するかはあまり知られていなかった。本研究は、この点を明らかにするために、小脳プルキンエ細胞上のGABA性シナプスで、プルキンエ細胞が強く脱分極することで起こるシナプス可塑性rebound potentiation (RP) に着目し、 α と β CaMKIIがRPにどのように寄与するかを調べた。

まず、RNAi法を用いて α あるいは β CaMKIIの発現を抑制し、電気生理学実験を行ってRPへの影響を調べたところ、 α CaMKIIの発現を抑制してもRPに影響がない一方で、 β CaMKIIの発現を抑制するとRPが起こらなくなることが分かった。したがって、RP誘導には β CaMKIIが必要であると考えられた。次に、それぞれのサブユニットの過剰発現を行った。そして、 α CaMKIIを過剰発現するとRPが起こらないことが分かった。したがって、 α CaMKIIはRPを抑制すると考えられ、 α と β CaMKIIはRP誘導において対照的な役割を果たすことが判明した。このことから、プルキンエ細胞で抑制的な役割を果たす α CaMKIIが優位となると、RPが障害されると推測された。そこで、CaMKIIサブユニットの発現比が α 優位でなくなればRP障害が回復するか否かを調べるために、 β CaMKIIと共に α CaMKIIの発現を抑制、あるいは α CaMKIIと共に β CaMKIIを過剰発現した。その結果、両条件においてRPが回復し、RP誘導にはCaMKIIの量ではなく、両サブユニットの発現比率が重要であることが判明した。続いて、 β CaMKIIがなぜRPに必要なのかを明らかにするために、上述した β CaMKIIの2つの特性を分離することを試みた。 α と β CaMKIIのドメイン構造に着目して、 $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$ へ高い親和性を持つがF-actinと結合しない変異体と、その逆の変異体を作成した。これらの変異体を用いて行った実験により、RP誘導には β CaMKIIのもつ $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$ への高い親和性が重要であることが分かった。最後に、CaMKIIのサブユニット構成により、プルキンエ細胞内でのCaMKII活性が変化するか否かを、FRET法を用いて調べた。 α と β CaMKIIそれぞれの $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$ への親和性を反映するFRETプローブを作成し、RP誘導刺激前後でのCaMKII活性を測定した結果、 α CaMKIIは長期活性化できず、 β CaMKIIは長期活性化できることが分かった。

これらの研究により、RP誘導に α と β CaMKIIが対照的な役割を果たし、両サブユニットの発現量比がCaMKIIの長期活性化とRPの成否を決定することが明らかになった。

(続紙 2)

(論文審査の結果の要旨)

中枢神経細胞間での情報伝達を行うシナプスでは、神経活動依存的にその伝達効率が長期間変化するシナプス可塑性が起こり、それが学習・記憶の細胞レベルでの基礎過程と考えられてきた。シナプス可塑性の研究は、主にグルタミン酸を伝達物質とする興奮性シナプスで行われてきたが、近年GABAを伝達物質とする抑制性シナプスでも可塑性が起こることがわかった。それらの中でも、小脳の抑制性介在ニューロンとプルキンエ細胞間のGABA性シナプスで起こる可塑性のRebound Potentiation (RP)については、その発現機構・役割等が詳しく研究されてきた。RPは、プルキンエ細胞活動に伴う細胞内Ca²⁺濃度上昇が、Ca²⁺・カルモジュリン (Ca²⁺/CaM) 依存性キナーゼII (CaMKII) を活性化し、それがGABAに対するプルキンエ細胞応答を増強することにより起こることが分かっていた。ところで、プルキンエ細胞ではCaMKIIのαとβの2型が存在するが、各々がRP発現にどのように関与するかは不明であった。なお、βCaMKIIはαCaMKIIと比べてCa²⁺/CaMに対する親和性が10倍程度高く、アクチンフィラメントと結合するという特徴を有するが、そのシナプス可塑性制御における役割に関する研究は限られていた。そこで、長崎信博は、αおよびβCaMKIIがRP誘導にどのようにかわるかを、分子生物学・生化学・電気生理学・Ca²⁺濃度およびCaMKII活性の蛍光イメージング等多種の実験方法を組み合わせて検討した。

その結果、RP誘導にはβCaMKIIは必要だが、αCaMKIIはRP誘導を抑える方向にはたらくという興味深い結果が得られた。そして、詳細な検討により、αとβCaMKIIの存在量比がRPの成否を決めていることを明らかにした。さらに、両CaMKIIの対照的な役割がいかなる分子機構により生じるかを、変異CaMKIIを用いて検討し、αCaMKIIとβCaMKIIのCa²⁺/CaMに対する親和性の違いが、両者のRP誘導における対照的な役割の要因であることを明らかにした。βCaMKIIが多い状況では、細胞内Ca²⁺濃度上昇によって、CaMKIIの自己リン酸化による長期活性化が起こってRPが引き起こされる一方で、αCaMKIIが多い状況では、CaMKIIの自己リン酸化を妨げる脱リン酸化酵素活性に対して、Ca²⁺濃度上昇によるCaMKII全体の活性化が対抗できないために、CaMKIIの長期活性化が起こらず、RPも起こらないことが示唆された。

これらの研究により、RP誘導においてαとβCaMKIIが対照的な役割を果たして、両サブユニットの発現量比がCaMKIIの長期活性化とRPの成否を決定すること、そしてそれらがαCaMKIIとβCaMKIIのCa²⁺/CaMに対する親和性の違いによって起こることが明らかになった。この研究成果は、シナプス可塑性制御におけるCaMKIIサブタイプの役割の違いを示すとともに、そのメカニズムまで明らかにしたもので、シナプス可塑性制御の分子機構解明に寄与する重要な成果であり、本論文は博士(理学)の学位論文として価値あるものと認められる。また、平成27年1月14日に、論文内容とそれに関連した口頭試問を行い、その結果合格と認めた。

要旨公表可能日： 2015年 4月 1日以降